مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۲، شماره ۱ (شماره پیاپی ۴۶)، بهار ۱۳۸۸، ۸۰-۷۳

اثر راپامایسین بر رگ زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه

سعیده ظفربالانژاد[1*]، دکتر کاظم پریور[2]، دکتر جواد بهار آرا [3]، دکتر هما محسنی کوچصفهانی[4]

۱- دانشجوی دکترا تخصصی بیولوژی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۲ – استاد، دکترا تخصصی بیولوژی تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، تهران، ایران

۳ - استادیار، دکترا تخصصی بیولوژی تکوین جانوری،گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، مشهد، ایران

۴ – استادیار، دکترا تخصصی بیولوژی تکوین جانوری،گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت۸۷/۱۰/۲۲، تاریخ پذیرش ۸۸/۲/۲۳

چکیده

مقدمه: آنژیوژنز فرایندی پیچیده است که در وضعیت‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک نظیر پیشرفت و متاستاز تومور مشاهده می‌شود لذا هدف درمانی بسیاری از داروهای ضد تومور می‌باشد. راپامایسین از داروهای مهار کننده سیستم ایمنی است که در سال‌های اخیر در کنترل رشد تومورهای سرطانی کاربرد بالینی یافته است. در این پژوهش اثر راپامایسین بر آنژیوژنز در پرده کوریو آلانتوئیک جوجه بررسی شد.

روش کار: در طی یک مطالعه تجربی تعداد ۴۲ عدد تخم مرغ نطفه‌دار نژاد راس به طور تصادفی در ۳ گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمار تقسیم شدند. در روز دوم انکوباسیون روی تخم مرغ‌ها پنجره ایجاد گردید. روز هشتم پرده کوریوآلانتوئیک در گروه شاهد آزمایشگاهی با دایمیتل سولفوکساید و در گروه تیماربا محلول راپامایسین آغشته گردید. روز دوازدهم از تمام نمونه‌ها به کمک فوتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی عکس تهیه شد و تعداد و طول انشعابات عروقی روی پرده کوریوآلانتوئیک اندازه‌گیری گردید . داده های کمی حاصل به کمک آزمون t تحلیل شد($p<۰/۰۵$).

نتایج: میانگین تعداد(۴۲±۷/۲۶) و طول (۵/۰۵ ±۵۷ /۲۵ سانتی متر) انشعابات عروقی در نمونه‌های شاهد با تعداد (۴۲/۹۳±۸/۳۷) و طول (۵۵/۶۶±۱۰/۴۴ سانتی متر) انشعابات عروقی در شاهد آزمایشگاهی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. مقایسه میانگین تعداد(۵/۲۸ ± ۲۹/۳۶) و طول (۱۰/۲۲± ۴۴/۵۵ سانتی متر) انشعابات در تیمار با شاهد، کاهش معنی‌دار نشان داد($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: راپامایسین دارای اثر مهاری برآنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جوجه می‌باشد و تعداد و طول انشعابات عروقی را در اطراف محل تیمار کاهش می‌دهد.

واژگان کلیدی: آنژیوژنز، پرده کوریوآلانتوئیک، راپامایسین، تومور

***نویسنده مسئول:** مشهد، خیابان راهنمایی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، گروه زیست شناسی

Email: Mojgan-zafar@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

تکوین سیستم عروقی مهره‌داران فراتر از منشعب شدن ساده رگ‌های خونی بوده و نیازمند یک کنترل دقیق است. پژوهش‌های اخیر نقش مهم برنامه‌های ژنتیکی، به ویژه ضرورت حضور برخی خانواده‌های مولکولی و رسپتور این مولکول‌ها را در سلول‌های آندوتلیالی رأس عروق در پدیده آنژیوژنز نشان می‌دهد(۱). آندوتلیوم یک نقش محوری در بسیاری فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک ایفا می‌کند و بیان ژن‌های ویژه مختلف نظیر مولکول‌های ویژه آندوتلیالی و ژن‌های خانواده رونـدابوت (Roundabout) در این سلول‌ها شناسایی شده است(۲، ۳). علاوه بر این بسیاری از میانجی‌های ماست سل ها نظیر فاکتور سلول بنیادی (Stem Cell Factor- SCF)، فاکتور رشد اپیتلیال (Epithelial Growth Factor-EGF)، فاکتور اساسی رشد فیبروبلاستی (Basic Fibroblast Growth Factor- BFGF) و فاکتور رشد مشتق از پلاکت ها -Platlet Derivative Growth Factor) (PDGF به علاوه خانواده ژنی TGFβ (Transforming Growth Factor β) آنژیوژنیک بوده و فعالیت سلول‌های آندوتلیال را تنظیم می‌کنند(۴، ۵). یکی از مهم‌ترین فاکتورهای آنژیوژنیک فاکتور رشد عروقی آندوتلیالی -Vasculo-Endothelial Growth Factor) (VEGF است، این فاکتور به کمک دو رسپتور ویژه که فقط در سلول‌های آندوتلیالی بیان می‌شوند، هم مهاجرت سلول‌های آندوتلیالی و هم تکثیر و نفوذپذیری آن‌ها را تنظیم می‌کنند و علاوه بر این یک فاکتور ضد مرگ برنامه‌ریزی سلول در سلول‌های آندوتلیالی است. VEGF هم‌چنین فاکتور تمایز سلولی می‌باشد(۶). علاوه بر VEGF ، گزارش‌های اخیر بر اساس روش هدف گیری ژنی در موش نشان دهنده روابط متقابل سلول‌های آندوتلیال و ماتریکس بین سلولی است که در گسترش روش‌های کلینیکی مرتبط با تأثیر داروهای ضد رگ زایی در کنترل تومورهای انسانی مورد توجه می‌باشد(۷). راپامایسین از داروهایی است که امروزه کاربرد نسبتاً وسیعی در درمان انواع سرطان دارد. این دارو ۳۵ سال پیش از یک باکتری ساکن خاک به دست آمد و به عنوان یک ترکیب ضد قارچ به کار گرفته شد. سپس در دهه ۱۹۹۰ مشخص شد که راپامایسین دارای اثر مهاری برسیستم ایمنی است و از آن پس در پیوند کلیه مورد استفاده قرار گرفت(۸). راپامایسین در مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز به عنوان یک عامل مؤثر فرودست فعالیت می‌کند که در رشد و بقاء تکثیر سلولی دخالت دارد(۹). راپامایسین در گروه داروهای مهارکننده هدف راپامایسین در پستانداران(mammalian Target of Rapamycin-mTOR) قرار دارد با توجه به این که mTOR ورودی چندین مسیر بالادست نظیرمسیر فاکتور رشد وابسته به انسولین و برخی میتوژن‌ها را همگرا می‌کند. بر هم خوردن نظم مسیر آن می‌تواند به عنوان یک فاکتور مؤثر در برخی بیماری‌ها و به ویژه انواع سرطان مطرح شود(۱۰، ۱۱). mTOR یک سرین/ تیروزن کیناز حفاظت شده است که ترکیبات مختلف درگیر در ترجمه بسیاری پروتئین‌ها را فسفریله می‌کند و در نتیجه موجب تنظیم کاهشی سنتز برخی پروتئین‌ها می‌گردد(۱۲). لذا این مسیر می‌تواند هدف جالب توجه بسیاری از روش‌های درمانی سرطانی قرار گیرد(۱۳). بیشتر تحقیقات پایه‌ای راپامایسین به عنوان آنتی تومور در مدل حیوانی موش با سرطان‌های متداول در کودکان نظیر استئوسارکوما، رابدومیوسارکوما و لوسمی لنفوبلاستیک انجام گرفته است(۱۴). آنالوگ‌های راپامایسین با ویژگی‌های دارویی پیشرفته به صورت بالینی هم در کنترل پیوند اعضاء پس از عمل پیوند و هم در درمان تنگی مجدد شریان‌های کرونر پس از آنژیوپلاستی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۵). پژوهش ها مشخص کرده‌اند که مهار کننده‌های mTOR در درمان بیماران با کارسینومای کلیوی پیشرفته اثرات قابل توجهی نشان می‌دهند(۱۶). با توجه به این که یکی از راه‌های جلوگیری از پیشرفت و متاستاز تومور کنترل پدیده آنژیوژنز یا تشکیل رگ‌های خونی جدید است، لذا در این پژوهش

Archive of SID
www.SID.ir

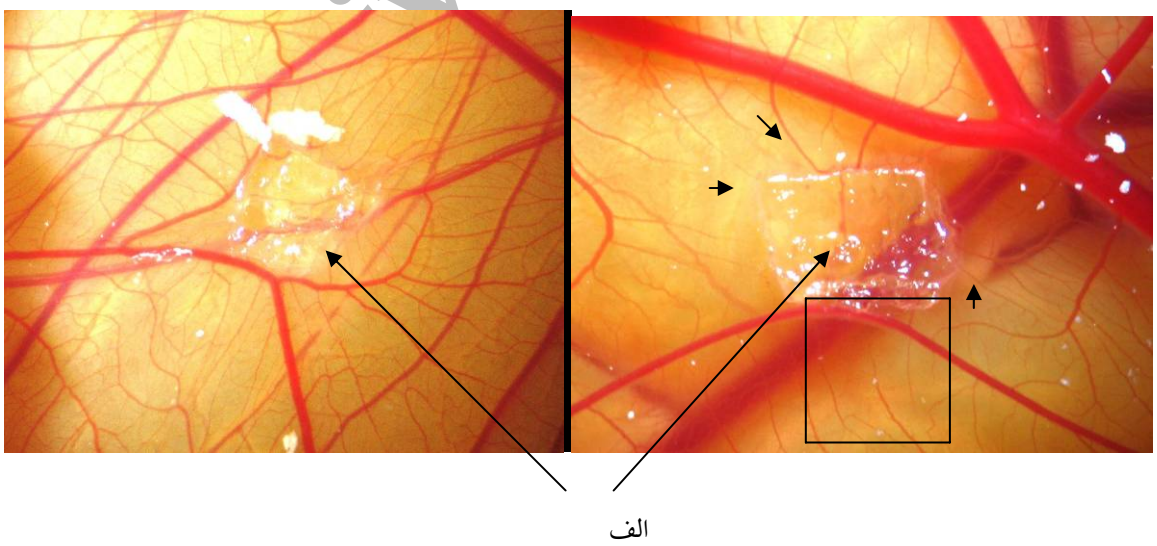
اثر راپامایسین بر فرایند آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه بررسی شده است.

روش کار

این پژوهش یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی است که در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست شناسی تکوینی جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۸۷-۸۶ انجام شد و از تخم مرغ‌های نطفه‌دار نژاد راس (Ross) به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده گردید. نمونه‌های مورد مطالعه از شرکت مرغداران طوس مشهد تهیه شدند. تعداد ۴۲ عدد تخم مرغ نطفه‌دار در ۳ گروه آزمایشی به صورت تصادفی توزیع شدند که شامل گروه شاهد که درشرایط طبیعی نگهداری شد، گروه شاهد آزمایشگاهی که با حلال دایمتیل سولفوکساید (Dimethyle Sulfoxide -DMSO) تیمار شد و گروه تجربی تیمار با راپامایسین می گردید. تخم مرغ‌های نطفه‌دار در دستگاه جوجه کشی در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد (دستگاه جوجه‌کشی تحقیقاتی ۳۰۰ خانه ساخت شرکت دامدشت، مشهد، ایران) قرار گرفتند(شکل ۱). در روز دوم انکوباسیون در شرایط کاملا استریل ایجاد شده توسط هود لامینار (Telstar ,Spain AV-100) بخشی از پوسته تخم مرغ‌ها برداشته شده و توسط لامل و پارافین استریل (پارافین فارا، ایران) پنجره‌ای در یک طرف تخم مرغ‌ها ایجاد گردید. سپس تخم مرغ‌ها به انکوباتور برگردانده شدند و در روز هشتم انکوباسیون پنجره‌ها در شرایط استریل برداشته شده و روی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه‌ها یک اسفنج ژلاتینی که شامل آلبومین سفیده تخم مرغ و محلول آگار در نرمال سالین به نسبت مساوی که به صورت تازه در شرایط استریل تهیه می شد بود به ابعاد ۱×۴×۴ میلی‌متر قرار داده شد. در نمونه‌های تیمار با راپامایسین، به هر اسفنج مقدار ۵ میکرولیتر محلول راپامایسین اضافه شد (قرص های راپامیون ۱ میلی‌گرمی حل شده در DMSO مارک آلمان و مقدار راپامایسین با در نظر گرفتن دوز مؤثر دارو در انسان که ۲ میلی‌گرم برای ۶۰ کیلوگرم وزن است و وزن متوسط جنین‌های ۸ روزه که به طور متوسط ۲/۳ گرم است، محاسبه شده بود) و در نمونه‌های شاهد آزمایشگاهی، به اسفنج ژلاتینی مقدار ۵ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. سپس محل پنجره مجدداً پوشانیده و تخم مرغ‌ها به انکوباتور برگردانده شدند. در روز دوازدهم انکوباسیون در تمام نمونه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمار با راپامایسین از محدوده محل قرار گیری اسفنج ژلاتینی به کمک فوتو استرئو میکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess, Germany) تصاویری با درشتنمایی ۴ × ۱۰×۰/۶۵ تهیه شد. تصاویر با برنامه فوتوشاپ در یک مونیتور ۱۵ اینچ (BenQ , Iran) مورد بررسی قرار گرفتند. متغیرهای مورد بررسی عبارت بودند از تعداد و طول انشعابات عروقی که در سطح مقطع یکسان (۴ مربع به ابعاد ۳ سانتی متر در ۴ طرف اسفنج ژلاتینی در روی تصویر مونیتور) برای تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. با توجه به این که پرده کوریوآلانتوئیک یک ساختار آناتومیکی قرص مانند و پهن یا ضخامت ۴۰۰ میکرومتر است، تمام عروق موجود در مربع های ذکر شده قابل شمارش بوده و در اندازه‌گیری‌ها منظور گردیدند(۱۷) (شکل ۲). به جهت جلوگیری از خطا درتمام مربع‌ها ۳ بار اندازه‌گیری تکرار شد. داده‌های کمی حاصل به کمک نرم افزار آماری SPSS و به روش آزمون t در سطح معنی $p<۰/۰۵$ تجزیه و تحلیل شد و آزمون‌های تکمیلی به روش من - ویتنی و رسم جدول آنوا انجام گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۱. انکوباتور جوجه کشی ساخت شرکت دامدشت- ایران . الف- محفظه تأمین بخار آب ب - رطوبت سنج ج - ترموستات د - تخم مرغ‌هایی را نشان می‌دهد که در یک طرف آنها پنجره ایجاد شده است، لذا از روی ریل‌های موجود در محفظه دستگاه کنار گذاشته شده‌اند تا چرخش آنها به صورت دستی انجام شود ه - کلید تنظیم دمای دستگاه



شکل ۲. نمایش محل قرار گرفتن اسفنج و سطوح اندازه‌گیری. تصویر سمت راست نمونه تیمارشده با راپامایسین و نمونه سمت چپ نمونه شاهد است. فلش‌های سیاه کاهش محسوس تعداد انشعابات عروقی را در نمونه تیمار شده با راپامایسین نشان می‌دهد . مربع سیاه نشان دهنده یکی ازسطوح اندازه گیری می باشد. الف- اسفنج ژلاتینی

www.SID.ir

نتایج

مقایسه میانگین تعداد (۷/۲۶±۴۲) و طول (۵/۰۵ ±۵۷/۲۵ سانتی متر) انشعابات عروقی در نمونه شاهد با تعداد (۸/۳۷±۴۲/۹۳) وطول (۱۰/۴۴ ±۵۵/۶۶ سانتی متر) انشعابات در نمونه شاهد آزمایشگاهی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در حالی که مقایسه میانگین تعداد(۵/۲۸ ± ۲۹/۳۶) و طول (۱۰/۲۲± ۴۴/۵۵ سانتی متر) انشعابات در نمونه‌های تیمار با راپامایسین با تعداد و طول انشعابات روقی در شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد ($p<۰/۰۵$).

بحث

علیرغم پیشرفت‌های زیاد کنونی در زمینه کنترل و درمان تومورهای بدخیم هنوز هم ارائه روش‌های درمان‌های و داروهای شیمیایی جدید مورد توجه پژوهش گران می‌باشد. دراین جهت توجه به مسیرهای مولکولی درگیر در رشد تومورها و شناسایی راه‌های کنترل این مسیرها توجه بیشتری را به خود جلب کرده است. لذا داروهای با هدف مولکولی خاص ارائه گردیده است. یکی از این ترکیبات شیمیایی داروهای گروه راپامایسین هستند که در گروه مهار کننده‌های mTOR قرار می‌گیرند . تمام مهار کننده‌های mTOR به mTOR کیناز متصل می‌شوند ودر نهایت دو اثر مهم دارند، اول این که mTOR یک میانجی فرودست در مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل ۳ کیناز/تیروزین کیناز است و این مسیر در تعداد زیادی از سرطان‌ها بیش از اندازه فعال می‌شود که این فعالیت زیاد می‌تواند موجب فعالیت بیش از حد mTOR کیناز شود و دومین اثر بزرگ و قابل توجه مهار mTOR آنتی آنژیوژنز است که باکاهش سطوح VEGF صورت می‌گیرد(۶). مطالعات نشان داده است که تنظیم افزایشی VEGF توسط تیروزین کیناز از طریق محل‌های اتصال اسپلایزوزوم ۱ (Sp1) واقع در بخش پروگزیمال راه انداز ژن میانجی‌گری می‌شود و اسپلایزوزوم ۱ در پاسخ به تیروزین کیناز، القاء mRNA مربوط به VEGF را پیش می برد(۱۸). حضور مهار کننده‌های mTOR این روند را بلوک می‌کند که این مسئله باعث کنترل رشد سلول می‌شود. داروهای مشابه با راپامایسین را داروهای با هدف درمانی مولکولی می‌نامند زیرا برای مهار مولکول‌های خاص طراحی شده اند و بر تمام سلول اثر ندارند که این مسئله موجب کاهش اثرات جانبی سمی شیمی درمانی می‌گردد(۶). علاوه بر این مطالعات نشان داده که راپامایسین تکثیر سلول‌های عضله صاف را با توقف در مرحله G1 از چرخه سلولی بلوکه کرده و هم‌چنین علاوه برفعالیت ضد تکثیر سلولی، فعالیت ضد مهاجرتی نیز دارد(۱۹). از آنجا که در پدیده رگ زایی هر دو فعالیت تکثیر و مهاجرت سلولی ضروری است، علت کاهش تشکیل رگ‌های جدید در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه که در پژوهش حاضر مشاهده شد می‌تواند اثر احتمالی مهار راپامایسین براین دو ویژگی سلولی باشد. هم‌چنین راپامایسین با غیرفعال کردن mTOR اتوفاژی را القاء می‌کند که افزایش اتوفاژی خود می‌تواند راهی برای درمان بیماری‌های حاصل از تجمع برخی پروتئین‌ها در سلول، از جمله تخریب بافت‌های عصبی در بیماری هانتینگتون یا توبرکولوز باشد که فعالیت اتوفاژی توسط لیزوزوم‌ها منجر به حذف پروتئین‌های اضافی تجمع یافته در سلول می‌گردد(۲۰، ۲۱). امروزه استراتژی‌های درمانی که شبکه عروقی تشکیل شده در تومورهای در حال پیشرفت را هدف قرار می‌دهند، رو به توسعه هستند و هدف اصلی این استراتژی‌ها القاء قطع سریع فعالیت عروقی تومور با قطع جریان خون و در نتیجه مرگ سلول های تومور است، هم‌چنین اثر مهاری راپامایسین بر mTOR در موش‌ها به طور انتخابی گسترش میکروووسکولاتور موضعی را در تومورکنترل می‌کند و یک قطع ویژه در الگوی عروقی اولیه در تومور نشان می‌دهد. لکه گذاری وسترن نشان داده است که راپامایسین با یک فیدبک منفی بیان فاکتور بافتی میانجی گری شده توسط VEGF را کنترل می‌کند. در این پژوهش ما اثر مهاری راپامایسین را بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه مورد بررسی قرار دادیم و این اثر به

Archive of SID
www.SID.ir

صورت کاهش معنی‌دار در تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار با راپامایسین نشان داده شد که با نتایج به دست آمده از مطالعه روی تومورهای تجربی در موش توسط گوبا و همکاران در سال ۲۰۰۵ مطابقت دارد(۲۲). وی اثر مهاری راپامایسین را بر عروق تومورهای تجربی در مدل موش نشان داده و اعلام نمود که راپامایسین بر سایر بافت‌های طبیعی اطراف تومور بی تأثیر است و لذا تأثیر مهاری راپامایسین به طور انتخابی فقط بر بافت های توموری اعمال می‌گردد ولی نتیجه به دست آمده در پژوهش حاضر مهار رگ زایی توسط راپامایسین را در بافت طبیعی نشان می‌دهد و می‌تواند نشان دهنده اثر موضعی آن در محل تیماردر مقایسه با نتیجه‌گیری گوبا باشد.

نتیجه گیری

نتیجه این پژوهش نشان می‌دهد که راپامایسین دارای اثر مهاری بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه است و تشکیل رگهای خونی را به طور موضعی در محل تیمار را کاهش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران محترمی که در انجام این پژوهش همکاری نموده‌اند، به ویژه سرکار خانم دکترآذرنوش جعفری مدیر محترم گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، آقای محمد علی بهمنیار مدیر بازرگانی و آقای محمد مرادیان مسئول بخش فروش شرکت مرغداران طوس وکارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی تکوین جانوری خانم‌ها زهره میرآخوری و معصومه صبوری تشکر و قدر دانی می‌شود.

منابع

1. Suchting S, Bicknell R, Eichmann A. Neuronal clues to vascular guidance. Exp Cell Res 2006; 312(5):668-75.

2. Huminiecki L, Bicknell R. In silico cloning of novel endothelial-specific genes. Genome Res 2000; 10(11): 1796-806.

3. Huminiecki L, Gorn M, Suchtings S, Poulsom R, Bicknell R. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. Genomics 2002; 79(4): 547-52.

4. Hiromatsu Y, Toda Sh. Mast cells and angiogenesis. Micros Res Tech 2003; 60: 64-69.

5. Lioyd R, Vidal S, Horvath E, Kavacs K. Angiogenesis in normal and neoplastic pituitary tissues. Micros Res Tech 2003; 69:244-250.

6. Breier G. Unsicker K, Kriegistein K. Cell signaling and growth factors in development. Weinheim. WILLEY- VCH verlag gmbH; 2006. 909-917.

7. Livanainen E, Kahan V, Heino J, Elenius K. Endothelial cell-matrix intractions. Micros Res Tech 2003; 60: 133-22.

8. Mc Gurl D. From Easter Island Soil to treating sarcoma – Rapamyon Derivative [monograph on the Internet]. Liddy Shriver Sarcoma Initiative. 2005. Available from: http://www.sarcomahelp.org

9. Quesada A, Munoz-Chapuli R, Medina M. Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. Med Res Reviews. 2006; 26 (4). 483-530.

10. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. Gen Dev 2004; 18(6): 1926-45.

11. Beevers C, Li F, Liu L, Huang S. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathway in cancer cells. Int J Cancer 2006; 119(4): 757-64.

12. Brugarolas J, Lei K, Hurley R, Manning B, Reiling J, Hafen E, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. Genes & Development 2004; 18: 2893-2904.

13. Groner B. Targeted interference with signal transduction events. In: Bulay A, Lane H. Recent Result in Cancer Research. Berlin Heidelberg: Springer; 2007.p: 99-124.

14. Jude ST, Mortos CH. Rapamycin study is first stage in development of new treatment

Archive of SID
www.SID.ir

medical studies trails. Molecular Pharmacology; news-medical. net 2007.
15. Inoki K, Ouyang H, Li y, Guan K. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2005; 69(1): 79-100.
16. Cho D, Signoretti S, Regan M, Mier J, Atkines B. The role of mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of advanced renal cancer. American Association for Cancer Research 2007; 13(15): 758-63.
17. Ruggerio M, Bottaro D, Liguri G, Gulisano M, Peruzzi B, Pacini S. 0.2 T magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioalantoic membrane. Bioelectromag. 2004; 25: 390-394.
18. Pore N, Shuang L, Shu H, Li B, Haas Kogan D, Stoke D, et al . Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. MBC 2004; 15(11): 4841-4853 .
19. Ruygrok PN, Muller DW, Serruys PW. Rapamycin in cardiovascular medicine. Int Med J 2003; 33(3): 103-109 .
20. Floto RA, Sarkar S, Perlstein EO, Kampmann B, Schreiber SL, Rubinsztein DC. Small molecules enhancers of rapamycin-induced TOR inhibition promote autophagy, reduce toxicity in Huntington's disease models and enhance killing of mycobacteria by macrophages. Autophagy 2007; 3(6):620-2.
21. Ravicumar B , Berger Z, Vacher C, O'kane CJ, Rubinsztein DC .Rapamycin pre-treated protocols. Hum Mol Genet 2006; 15(7): 1209-16.
22. Guba M, Yezhelyev M, Eichhorn ME, Schmid G , Ischenko I , Papyan A, et al. Rapamycin induced tumor-specific thrombosis via tissue factor in the presence of VEGF. Blood 2005; 105(11):4463-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Arak University of Medical Sciences *Original Article*
spring 2009; 12(1): 73-80

The Effect of Rapamycin on Angiogenesis in Chick Chorioalantoic Membrane

Zafar Balanejad M[1]*, Parivar K[2], Baharara J[3], Mohseni Koochesfahani MH[4]

1- PhD student in Biology, Biology Department, Science & Research Branch of Tehran Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Professor, PhD in Biology, Biology Department, Science & Research Branch of Tehran Islamic Azad University , Tehran, Iran.
3- Assistant professor, PhD in Biology, Biology Department, g94
Islamic Azad University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4- Assistant Professor, Biology Department, Science & Research Branch of Tehran Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received 11 Jan, 2009 Accepted 13 May, 2009

Archive of SID

Abstract

Background: Angiogenesis is a complex process that occurs in many physiologic and pathologic conditions such as invasion and metastasis of tumors. Therefore, it is the target of many clinical treatments. Rapamycin is one of the immune system inhibitor drugs that recently has been used for controlling different types of cancer. In this study, the effect of Rapamycin on angiogenesis in chicks' chorioalantoic membrane was investigated.

Methods and Materials: In this experimental study, we used 42 Ross fertilized eggs that were divided into 3 random groups: control, sham-exposed (treated by Dimethyle sulfoxide-DMSO-) and treated with Rapamycin. In 2th day, a window was opened on eggs in the sterile condition. Later, in 8th day, a gelatin sponge appeared on chorioalantoic membrane and was soaked with 5 µl Rapamycin in treatment group and 5 µl DMSO in the sham-exposed group. In 12th day, CAMs were examined and photographed by Research Photostereomicroscope in all cases. The numbers and lengths of vessels around the sponges were measured and compared with each other by T-Test ($p<0.05$).

Results: The mean of number (42 ±7.26) and length (57.25±5.05 cm) for vessels in the control group and mean of number (42.93±8.37) and length (55.66±10.44 cm) in sham-exposed group was'nt any significant differences. There was a significant decrease in mean number (29.36±5.28) and length (44.55±10.22) of vessels in Rapamycin with control group.

Conclusion: It seems Rapamycin has an inhibitory effect on angiogenesis in chicks' chorioalantoic membrane. It decreases the number and length of vessels around treated area.

Key words: Angiogenesis, Chorioalantoic Membrane, Rapamycin, Tumor.

*Corresponding author;
Email: Mojgan_zafar@yahoo.com
Address: Biology Dept. Faculty of science ,Science & Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran

www.SID.ir